



PATENT
Attorney Docket No. 05552.0738-02000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
Michael MACH et al.)
Application No.: 08/460,715) Group Art Unit: 1643
Filed: June 2, 1995) Examiner: D. Lee
For: Structural Phosphoprotein (PP28))
of Human Cytomegalovirus (HCMV),)
The Preparation and Use Thereof)

RECEIVED

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

MAR 9 1999
MATRIX CUSTOMER
SERVICE CENTER

SUBMISSION OF CERTIFIED TRANSLATION
OF PRIORITY DOCUMENT

Sir:

Further to the Amendment filed November 30, 1998, Applicants' submit a certified translation of the priority document, German Application No. P 38 05 717.4, filed on February 24, 1988.

Applicants respectfully point out that this application is a divisional of application Serial No. 07/746,161, filed August 14, 1991, which is a continuation of application Serial No. 07/313,553, filed February 22, 1989. The instant application, and all other applications in this chain, claim the benefit of foreign priority under 35 U.S.C. § 119, of application P 38 05 717.4, filed February 24, 1988, in the Federal Republic of Germany.

LAW OFFICES

FINNEGAN, HENDERSON,
FARABOW, GARRETT,
& DUNNER, L.L.P.
1300 I STREET, N.W.
WASHINGTON, DC 20005
202-408-4000

Application No.: 08/460,715
Attorney Docket No. 05552.0738-02000

In accordance with the 35 U.S.C. § 119, a certified copy of the German priority document was filed in the original 07/313,553 application on February 22, 1989. In order to demonstrate that the disclosure of the priority document is the same as the disclosure of the instant application, filed herewith is a certified translation of the priority document, German Application No. P 38 05 717.4, filed on February 24, 1988.

Please grant any extensions of time required to enter this document and charge any additional required fees to our deposit account 06-0916.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

By: _____



Robert A. Pollock
Reg. No. 43,008

Dated: March 5, 1999

LAW OFFICES

FINNEGAN, HENDERSON,
FARABOW, GARRETT,
& DUNNER, L.L.P.
1300 I STREET, N. W.
WASHINGTON, DC 20005
202-408-4000

RECEIVED

IN THE UNITED STATES PATENT OFFICE MAR 9 1999

MAILING CENTER
SERVICE CENTER

I, Stephen DRANE BSc PhD BDÜ,
translator to RWS Group plc, of Europa House, Marsham Way,
Gerrards Cross, Buckinghamshire, England declare;

1. That I am a citizen of the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland.
2. That I am well acquainted with the German and English languages.
3. That the attached is, to the best of my knowledge and belief, a true translation into the English language of the accompanying copy of the specification filed with the application for a patent in Germany on 24 February 1988 under the number P 38 05 717.4 and the official certificate attached hereto.
4. That I believe that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are true; and further that these statements are made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardise the validity of the patent application in the United States of America or any patent issuing thereon.



For and on behalf of RWS Group plc

The 10th day of February 1999

FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY
CERTIFICATE

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

of

Marburg/Germany

have filed a Patent Application under the title:

"Structural phosphoprotein (pp 28) of human
cytomegalovirus (HCMV), the preparation and use
thereof"

on 24 February 1988 at the German Patent and Trademark Office.

The attached documents are a correct and accurate reproduction
of the original submission for this Patent Application.

The German Patent and Trademark Office has for the time being
given the Application the symbols C 12 N, C 07 H and C 12 P of
the International Patent Classification.

Munich, 26 January 1999
German Patent and Trademark Office
The President
PP
Wehner

File No: P 38 05 717.4

Description

5 Structural phosphoprotein (pp 28) of human cytomegalovirus (HCMV), the preparation and use thereof

The invention relates to a structural HCMV phosphoprotein of 28 kD (pp28) and immunogenic parts thereof, to the preparation thereof by genetic manipulation, and to the use thereof as a diagnostic aid and for producing antibodies and vaccines.

To date, HCMV polypeptides with molecular weights of about 28 kD have been described in several investigations. Roby and Gibson (Roby, C. and Gibson, W. (1986) J. Virol. 59, 714-727) and Nowak et al. (Nowak, B. et al. 15 (1984) Virology 132, 325-338) describe a phosphoprotein of 24 kD and 29 kD, respectively. It is suggested in both publications that this protein is localized in the matrix. Pereira et al. (Pereira, L. et al. (1984) Virology 139, 73-86) describe a monoclonal antibody which 20 precipitates from infected cell extracts a 25 kD glycoprotein which belongs to the glycoprotein D complex. Irmiere and Gibson (Irmiere, A. and Gibson, W. (1985) J. Virol. 56, 277-283) have identified a 28 kD protein which was found both in the A and in the B capsid of various 25 HCMV strains. Re et al. (Re, M.C. et al. (1985) J. Gen. Virol. 66, 2507-2511) investigated a 28 kD structural protein using a monoclonal antibody P2G11 (MAb P2G11). It remains unclear whether this was the protein described by Pereira et al. (loc. cit.) or that described by Nowak et 30 al. (loc. cit.).

Since a structural protein of 28 kD is recognized by almost all highly positive human sera, and thus the 28 kD proteins must include one of the principal immunogens of HCMV, it appears desirable to identify and to isolate the

HCMV gene coding for it. Another aim was subsequently to express this gene in suitable host systems in order to characterize it more accurately and, where appropriate, to establish it as another principal immunogen of HCMV.

- 5 It has been found that it is possible with the MAb P2G11 (Re et al. loc. cit.) to identify and isolate from an HCMV cDNA gene bank clones which code for a 28 kD phosphoprotein (pp28). To date no phosphoprotein 28 kD in size has been disclosed.
- 10 To prepare the gene bank, human prepuce fibroblast cells were infected with HCMV, strain Ad 169, and, 96 to 120 hours after the infection, the poly(A)⁺-RNA was isolated, converted into ds-DNA and, without size fractionation, inserted into the commercially available phage expression 15 vector λgt11. For this, the vector was cleaved with EcoRI and treated with alkaline phosphatase (from calf intestine) in order to suppress intramolecular religation. The cDNA was, by attachment of EcoRI linkers, inserted between the phage arms and packaged in vitro. In this 20 way, 100 ng of ds-cDNA resulted in a gene bank which contained about 5×10^5 independent recombinants and 18% wild-type phages.

The screening of the gene bank was carried out by the method of R.A. Young and R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. 25 Sci. USA 80 (1983), 1194-1198, but with the modification that horseradish peroxidase was coupled to protein A, and 4-chloro-1-naphthol was used as detection system, employing the monoclonal antibody P2G11 described above. In this immunoscreening the colonies which are present on 30 nitrocellulose filters are cautiously lysed, incubated with above-described monoclonal antibodies and, after removal of unbound reactants, positive plaques are detected using the said modified detection system.

On screening of the gene bank with MAb P2G11, two positive signals were obtained from 150,000 recombinant 35

lambda^{gt}11 phages. One clone with an insertion of about 270 basepairs (bp) was selected and purified for further characterization; it was called BUML-1.

5 The E.coli strain Y 1089 was infected with the recombi-
nant phage, and the synthesis of the β -galactosidase
fusion protein was induced by addition of isopropylthio-
galactoside (IPTG). This resulted in the formation of a
fusion protein of about 130 kD, which is distinctly
larger than the β -galactosidase (118 kD) and is not found
10 in E. coli cells infected with lambda gt11; nor is it
present in cells infected with BUML-1 but not induced. In
Western blot analyses only the 130 kD polypeptide reacted
with MAb P2G11. Hence it is evident that the recombinant
clone BUML-1 synthesizes a fusion protein containing a
15 HCMV protein portion.

20 The cDNA insertion of about 270 bp was now used to locate
the gene for the HCMV protein in the viral genome: for
this purpose, the abovementioned cDNA insertion was
hybridized with 8 cosmid clones which cover the entire
25 genome of HCMV (B. Fleckenstein et al. (1982) Gene 18,
39-46). The cosmid pCM 1058, which contains the Hind III
fragments P, R and S, hybridized with the cDNA. More
detailed Southern blot analysis of this region localized
the HCMV DNA fragment to a 500 bp KpnI/SmaI fragment on
25 the left-hand end of the Hind III R fragment (Fig. 1). It
was possible, using an SstII cleavage site on the
nucleotide 1877, to assign the cDNA to the right-hand Kpn
I/Sma I fragment in the genome orientation as shown in
Fig. 1.

30 The cDNA of the clone BUML-1 was sequenced (Sanger
method). The DNA sequence is underlined in Table 1.
Comparison with the viral DNA sequence in this genomic
region made it possible to assign unambiguously to a long
open reading frame (ORF) which extends from nucleotide
35 1400 to 1968 (Tab. 1). The molecular weight calculated
from the amino acid sequence corresponding to this ORF is

20933 d, which comprises a difference of about 7 kd from the values found. This probably derives from the fact that this protein is extremely hydrophilic and is moreover phosphorylated (see below). Computer analysis by the 5 method of Hopp and Woods (Hopp, P.P. and Woods, K.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 78, 3823-3828) shows that the most hydrophilic regions are in the area of amino acids (AA) 50-60 and 110-120. It has been found that MAb P2G11 recognizes an epitope encoded by the cDNA 10 of AA 7 to 95.

In Northern blot analyses the cDNA fragment of BUML-1 hybridized most strongly with a late mRNA which is 1.3 kb in size and is completely transcribed from the direction of the Hind III R fragment.

15 10 of 14 HCMV-positive sera selected at random reacted with p 28 derived from purified viruses; the same sera likewise reacted with a fusion protein (p 271, see Example 1) synthesized by a manipulated gene. When HCMV particles were phosphorylated in vitro (phosphorylated in 20 analogy to Roley, C. and Gibson, W. loc. cit.) it was possible to precipitate a phosphorylated p 28 both with MAb P2G11 and with antibodies against the fusion protein p 271 (see Example 1). This indicates that the cloned protein is phosphorylated and thus may be called pp 28.

25 Since it would be possible to isolate pp 28 in the quantities necessary for diagnostic aids and vaccines only with great technical elaboration, the mode of preparation by genetic manipulation according to the invention is particularly advantageous. It has emerged that not only 30 products expressed by eukaryotic cells but also expression products of bacteria have antigenic activity. Since bacteria do not produce phosphoproteins from foreign genes, it was not to be expected that "HCMV pp 28", or parts thereof, prepared in bacteria would also 35 have strong immunogenic activity. However, it has emerged that even such proteins are just as unambiguously recog-

nized by appropriate sera as is authentic pp 28.

Consequently, the invention relates to

- a) the purified and isolated DNA sequence according to Table 1 including its transcription products,
- 5 b) DNA structures and vectors containing this sequence in whole or in part,
- c) pro- or eukaryotic cells transformed with such DNA,
- d) the polypeptides, or parts thereof, expressed by these cells by reason of the transformation,
- 10 e) the amino acid sequences thereof and the use thereof as a diagnostic aid,
- f) antibodies against the polypeptides under (d) including their use for passive immunization, for diagnosis and for purifying said polypeptides,
- 15 g) vaccines against HCMV, which contain peptides and amino acid sequences from (e) alone or in combination,
- h) and a method for the preparation, by genetic manipulation, of the polypeptides, or parts thereof, mentioned in section (d).

20 Further embodiments of the invention are given in the examples which follow, the table and the claims.

Example 1: Construction and expression of the plasmid p271

25 Firstly, the plasmid pHM 7 was produced by inserting the approximately 500 bp KpnI-SmaI fragment (nucleotides 1443-1936 from Tab. 1) into M13mp11. The plasmid p 271 is

obtained by insertion of the approximately 500 bp EcoRI-Sma I fragment of pHM 7 into pEX-2 (Stanley, K. and P. Luzio (1984) EMBO Journal 3, 1429-1434). The plasmid p271 thus codes for a fusion protein of about 133 kD, composed of a pp 28 portion (about 18 kD) fused to a Cro/β-galactosidase hybrid protein (about 115 kD). Expression in suitable E.coli strains is induced by heat-inactivation of a temperature-sensitive repressor. E.coli pop 2136 (Stanley, K. and P. Luzio loc. cit.) was cultured to a density of 0.2-0.3 (A_{600nm}) at 30°C, and the synthesis of the fusion protein was induced by a rapid change in temperature to 42°C. After 90 min at 42°C, the cells were harvested, and the pp 28 protein was purified by known methods. The fusion protein contributes about 5% of the total protein mass.

Example 2: Optimization of pp 28 expression

By the reclonings described hereinafter it was possible (1) to improve overall the expression of pp 28 as a fusion protein and (2) to reduce the foreign portion in the fusion protein. The starting plasmid chosen was pBD2IC2OH (proposed in German Patent Application P 37 27 137.7). This plasmid thus codes for a β-galactosidase portion which is considerably (by more than 60%) shorter than with pEX-2, and induction was effected via the Lac promoter system by addition of isopropylthiogalactoside (IPTG).

Two strategies were chosen for the cloning of the pp28 DNA fragment from p271:

- 1) p271 was cut with EcoRI and SmaI, and the EcoRI protrusions were filled in using the Klenow fragment. The resulting approximately 500 bp fragment was inserted into the SmaI site of pBD2IC2OH. The linker region of the resulting plasmid pGB10 has the following DNA sequence (verified by indirect sequencing on the double strand):

(S)	E (filled in)	S
(m)	C	m
(a)	O	a
(I)	R	I

5

I

GATGGGGATCCCCATTCTGAGCTCGCCCGACC...CCCGGG

-----+-----+-----+-----ca. 500bp---

CTACCCCTAGGGGTTAACGCTCGAGCGGGCATGG:::GGGCC

from pBD2IC2OH>< from p 271 >< pp28... >

10 AspGlyAspProGlnPheGluLeuAlaArgThr...ProGly

2) The reading frame in the linker region of pBD2IC2OH was shifted by filling in the Bam HI site (--> plasmid pGB11). It was then possible for the EcoRI/SmaI fragment from p271 to be inserted, 15 without previous filling-in of the EcoRI site, directly into pGB11 which had been cut with EcoRI and NruI. The linker region of the resulting plasmid pGB12 has the following DNA sequence:

E	(S N)
c	(m r)
o	(a u)
R	(I I)
I	

20

I

GATGGGGATCGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCTGAGCTCGCCCGTACC...CCCGGA

25

I

-----+-----+-----+-----+-----ca. 500bp---

CTACCCCTAGCTAGGGGCCATGGCTCGAGCTAACGCTCGAGCGGGCATGG...GGGCT

from pGB11 >< from p271 >< pp28...>

AspGlyAspArgSerProGlyThrGluLeuGluPheGluLeuAlaArgThr...ProArg

30 Estimation of the color intensity of the relevant protein bands after fractionation of *E. coli* total extracts revealed that the p271-encoded protein, after its induction, made up about 5% of the total protein content, whereas the corresponding figures for pGB10 and pGB12 were throughout about 20%. If account is taken of the 35 fact that the foreign protein content in the pGB10- and pGB12-encoded fusion proteins is less than in that encoded by p271, it is evident that pp28 expression is increased about ten-fold by use of pGB10 or pGB12.

Key to Tab. 1

The open reading frame coding for pp 28 starts at nucleotide 1400 and ends at nucleotide 1968. The region of the cDNA of BUML-1 is indicated by a full line under 5 the relevant nucleotides (nucleotide 1416 to 1683). The depicted sequence starts (nucleotide 801) with the Hind III cleavage site of the S and R fragments. A protein sequence with partly overlapping reading frame from nucleotide 801 to 1460 is also indicated.

10 Key to Fig. 1

Upper part: physical genome map of HCMV for the restriction endonucleases Hind III and EcoRI.

15 Lower part: restriction map for the Hind III R fragment. The shaded area shows the region of the cDNA of the clone BUML-1.

Table 1

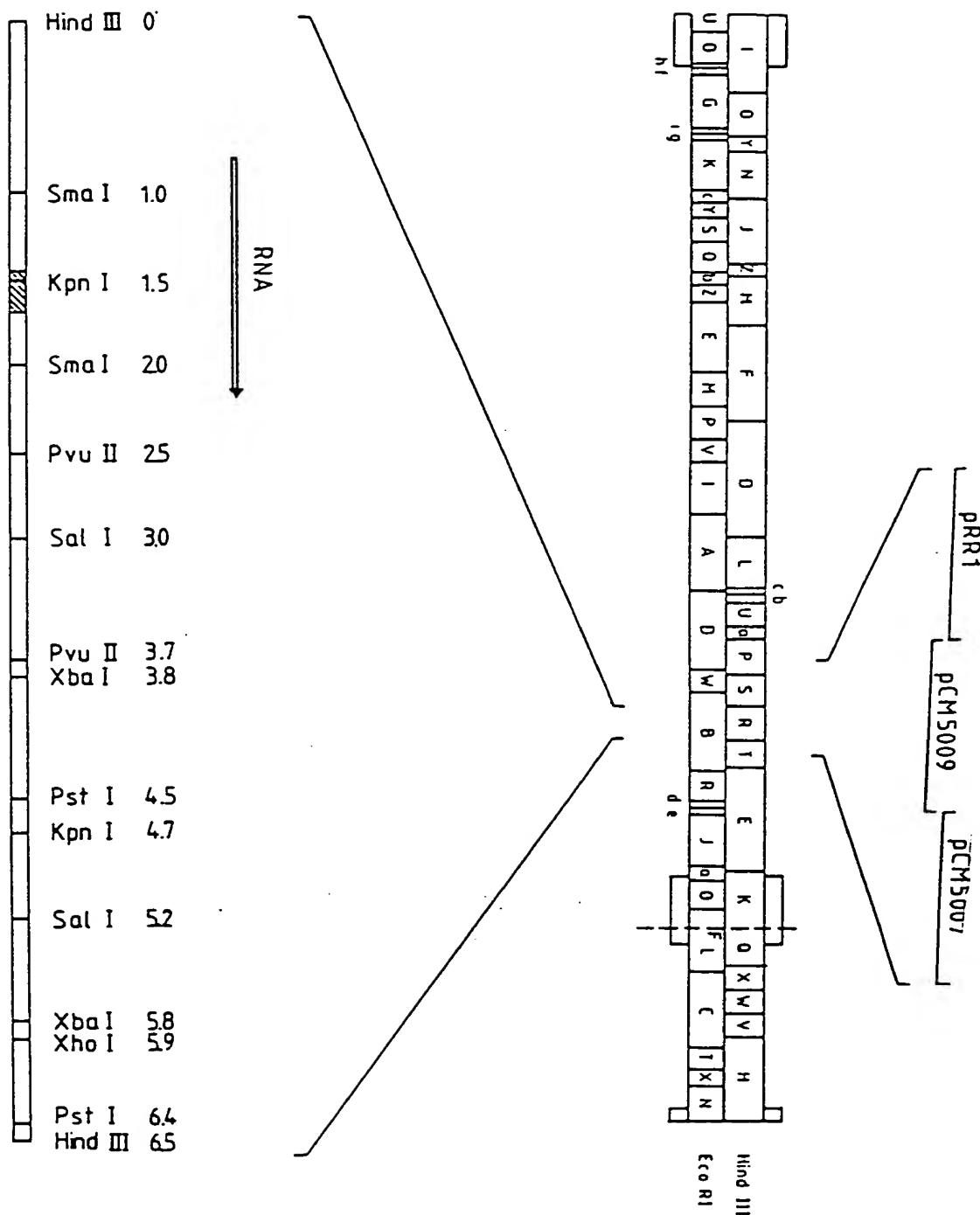
Claims

1. A structural phosphoprotein having a molecular weight of about 28 kd (pp 28) from human cytomegalovirus (HCMV) or immunogenic parts thereof, obtainable by expression of the gene which is located in the region of the fragment Hind III R of the genome of HCMV, strain Ad 169, or parts of this gene.
5
2. pp 28 and immunogenic parts thereof, obtained by expression of the gene which is located on a 1.0 kb SmaI fragment within the Hind III R fragment from the genome of HCMV, strain Ad 169, or parts of this gene.
10
3. pp 28 or parts thereof, obtained by expression of the gene corresponding to Table I, nucleotide 1400
15 to 1968.
4. DNA sequence 1400-1968 according to Table I, coding for pp 28, and alleles and derivatives.
5. A DNA structure or vector which comprises the pp 28-encoding gene or parts thereof as claimed in claim
20 1, 2, 3 or 4.
6. A prokaryotic or eukaryotic cell transformed with a DNA structure or vector as claimed in claim 5.
7. A method for the preparation of pp 28 or immunogenic parts thereof, which comprises bringing about the expression, in whole or in part, of the gene coding
25 for pp 28 as claimed in claim 1.
8. The method as claimed in claim 7, wherein the 1.0 kb SmaI fragment from the Hind III R fragment is employed.
- 30 9. The method as claimed in claim 7, wherein the gene

corresponding to Table I, nucleotide 1400-1936, is employed.

10. A diagnostic aid which contains proteins or parts thereof as claimed in claim 1 to 3.
- 5 11. A diagnostic aid which contains poly- or monoclonal antibodies against proteins as claimed in claim 1 to 3.
- 10 12. A diagnostic aid which contains DNA sequences or parts thereof as claimed in claim 4 or sequences hybridizing thereon.
13. A vaccine which contains proteins or parts thereof as claimed in claim 1, 2 or 3.
14. A vaccine which contains antibodies against proteins as claimed in claim 1, 2 or 3.

Figure 1



BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT in Marburg/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Strukturelles Phosphoprotein (pp 28) des menschlichen Cytomegalovirus (HCMV), seine Herstellung und Verwendung"

am 24. Februar 1988 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 H und C 12 P der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 26. Januar 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: P 38 05 717.4

Wehner

Beschreibung

Strukturelles Phosphoprotein (pp 28) des menschlichen Cytomegalovirus (HCMV), seine Herstellung und Verwendung

Die Erfindung betrifft ein strukturelles HCMV-Phosphoprotein von 28 kd (pp 28) und immunogene Teile davon, seine gentechnische Herstellung sowie seine Verwendung als Diagnostikum und zur Erzeugung von Antikörpern und Impfstoffen.

In mehreren Untersuchungen sind HCMV-Polypeptide mit Molekulargewichten von etwa 28 kd bisher beschrieben worden. Roby und Gibson (Roby, C. und Gibson, W (1986) J. Virol. 59, 714-727) und Nowak et al. (Nowak, B. et al. (1984) Virology 132, 325-338) beschreiben ein Phosphoprotein von 24 kd bzw. 29 kd. In beiden Veröffentlichungen wird vermutet, daß dieses Protein in der Matrix lokalisiert ist. Pereira et al. (Pereira, L. et al. (1984) Virology 139, 73-86) beschreiben einen monoklonalen Antikörper, der aus infizierten Zellextrakten ein 25 kd Glykoprotein präzipitiert, das zum Glykoprotein D-Komplex gehört. Irmiere und Gibson (Irmiere, A. und Gibson, W. (1985) J. Virol. 56, 277-283) haben ein 28 kd Protein identifiziert, das sowohl im A- als auch im B-Kapsid verschiedener HCMV-Stämme gefunden wurde. Re et al. (Re, M.C. et al. (1985) J. Gen. Virol. 66, 2507-2511) untersuchen ein 28 kd Strukturprotein mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers P2G11 (MAK P2G11). Dabei bleibt offen, ob es sich um das von Pereira et al. (a.a.O) oder um das von Nowak et al. (a.a.O.) beschriebene Protein handelt.

Da ein Strukturprotein von 28 kd von fast allen hochpositiven humanen Seren erkannt wird, und somit unter den 28 kd-Proteinen eines der Hauptimmunogene des HCMV zu finden ist, erschien es wünschenswert, das dafür kodierende HCMV-Gen zu identifizieren und zu isolieren. Ein weiteres Ziel bestand darin, dieses Gen dann in geeigneten Wirtsystemen zu exprimieren, um es genauer zu charakterisieren und gegebenenfalls als weiteres Hauptimmunogen von HCMV zu etablieren.

Es wurde gefunden, daß mit dem MAK P2G11 (Re et al. a.a.O.) aus einer HCMV-cDNA Genbank Klone identifiziert und isoliert werden können, die für ein 28 kd Phosphoprotein (pp 28) kodieren. Bisher war ein 28 kd großes Phosphoprotein nicht bekannt.

Zur Herstellung der Genbank wurde aus mit HCMV, Stamm Ad 169, infizierten menschlichen Vorhaut-Fibroblastenzellen 96 bis 120 Stunden nach der Infektion die poly(A)⁺-RNA isoliert, in ds-DNA überführt und ohne Größenfraktionierung in den handelsüblichen Phagen-Expressionsvektor λgt11 eingefügt. Hierzu wurde der Vektor mit EcoRI gespalten und mit alkalischer Phosphatase (aus Kälberdarm) behandelt, um die intramolekulare Religation zu unterdrücken. Durch Anfügen von EcoRI-Linkern wurde die cDNA zwischen die Phagenarme eingefügt und in vitro verpackt. Aus 100 ng ds-cDNA wurde so eine Genbank erhalten, die etwa 5·10⁵ unabhängige Rekombinanten und 18 % Wildtyp-Phagen enthielt.

Das "Screening" der Genbank erfolgte nach der Methode von R.A. Young und R.W. Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 1194-1198, jedoch mit der Abwandlung, daß Meerrettich-Peroxidase an Protein A gekoppelt wurde und 4-Chlor-1-naphthol als Detektionssystem diente, unter Einsatz des vorstehend beschriebenen monoklonalen Antikörpers P2G11. Bei diesem "Immunoscreening" werden die auf Nitrozellulosefiltern vorhandenen Kolonien vorsichtig lysiert, mit oben beschriebenen monoklonalen Antikörpern inkubiert und nach Entfernen ungebundener Reaktanden positive Plaques mit dem genannten modifizierten Detektionssystem nachgewiesen.

Beim "Screening" der Genbank mit MAK P2G11 wurden von 150000 rekombinanten Lambda gt11 Phagen zwei positive Signale erhalten. Ein Klon mit einer Insertion von etwa 270 Basenpaaren (bp) wurde für die weitere Charakterisierung

ausgewählt und gereinigt; er erhielt die Bezeichnung BUML-1.

Der E.coli Stamm Y 1089 wurde mit dem rekombinierten Phagen infiziert und die Synthese des β -Galactosidase-Fusionsproteins durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert. Hierbei wurde ein Fusionsprotein von etwa 130 kd gebildet, das deutlich größer als die β -Galactosidase (118 kd) ist und das nicht in E.coli-Zellen gefunden wird, die mit Lambda gt11 infiziert sind; es ist auch nicht in mit BUML-1 infizierten, aber nicht induzierten Zellen vorhanden. In "Western Blot" Analysen reagierte nur das 130 kd Polypeptid mit MAK P2G11. Es ergibt sich somit, daß der rekombinierte Klon BUML-1 ein Fusionsprotein mit einem HCMV-Protein-Anteil synthetisiert.

Die cDNA-Insertion von etwa 270 bp wurde nun verwendet, um das Gen für das HCMV-Protein im Virus-Genom zu lokalisieren. Hierfür wurde die o.g. cDNA-Insertion mit 8 Cosmid Klonen hybridisiert, die das gesamte Genom von HCMV umspannen (B. Fleckenstein et al. (1982) Gene 18, , 39-46). Das Cosmid pCM 1058, das die Hind III-Fragmente P, R und S enthält, hybridisierte mit der cDNA. Eine eingehendere "Southern Blot"-Analyse dieser Region begrenzte das HCMV-DNA-Fragment auf ein 500 bp Kpn I/Sma I-Fragment am linken Ende des Hind III-R-Fragments (Fig. 1). Mittels einer Sst II-Spaltstelle am Nukleotid 1877 war es möglich, die cDNA dem rechten Kpn I/Sma I Fragment in der Genomorientierung wie in Fig. 1 gezeigt zuzuordnen.

Die cDNA des Klons BUML-1 wurde sequenziert (Methode von Sanger). Die DNA-Sequenz ist in der Tabelle 1 unterstrichen. Durch Vergleich mit der viralen DNA-Sequenz in diesem genomischen Bereich konnte eine eindeutige Zuordnung zu einem langen offenen Leserahmen (ORF) getroffen werden, der

von Nukleotid 1400 bis 1968 reicht (Tab. 1). Das aus der zu diesem ORF korrespondierenden Aminosäuresequenz berechnete Molekulargewicht beträgt 20933 d, was einen Unterschied von etwa 7 kd zu den gefundenen Werten beinhaltet. Das beruht wahrscheinlich darauf, daß dieses Protein extrem hydrophil und ferner phosphoryliert (s.u.) ist. Die Computer-Analyse nach Hopp und Woods (Hopp, P.P. und Woods, K.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 3823-3828) zeigt, daß die hydrophilsten Regionen im Bereich der Aminosäuren (AS) 50-60 und 110-120 liegen. Es wurde gefunden, daß MAK P2G11 ein Epitop erkennt, das durch die cDNA von der AS 7 bis 95 kodiert wird.

In "Northern Blot"-Analysen hybridisierte das cDNA-Fragment von BUML-1 am stärksten zu einer 1,3 kb großen späten mRNA, die vollständig vom Hind III R-Fragment her transkribiert wird.

10 von 14 zufällig gewählten HCMV-positiven Seren reagierten mit p 28, das aus gereinigten Viren stammte; dieselben Seren reagierten ebenfalls mit einem Fusionsprotein (p 271, siehe Beispiel 1) aus gentechnischer Synthese. Bei in vitro phosphorylierten HCMV-Partikeln (phosphoryliert analog zu Roley, C. und Gibson, W. a.a.O.) konnte ein phosphoryliertes p 28 sowohl mit MAK P2G11 als auch mit Antikörpern gegen das Fusionsprotein p 271 (siehe Beispiel 1) präzipitiert werden. Das spricht dafür, daß das klonierte Protein phosphoryliert ist und somit als pp 28 bezeichnet werden kann.

Da pp 28 in den Mengen, die für Diagnostika und Vaccinen erforderlich sind, nur unter großem technischen Aufwand zu isolieren wäre, ist die erfindungsgemäße gentechnische Herstellungsweise besonders vorteilhaft. Es zeigte sich, daß nicht nur von eukaryotischen Zellen exprimierten Produkte antigen wirken, sondern auch Expressionsprodukte von Bakterien. Da Bakterien von Fremdgenen keine Phosphoproteine

erzeugen, war nicht zu erwarten, daß auch bakteriell hergestelltes "HCMV-pp 28" oder Teile davon stark immunogen wirken. Es zeigte sich jedoch, daß auch solche Proteine von entsprechenden Seren ebenso eindeutig erkannt werden wie authentisches pp 28.

Erfindungsgegenstand sind folglich

- a) die gereinigte und isolierte DNA-Sequenz gemäß Tabelle 1 einschließlich ihrer Transkriptionsprodukte
- b) diese Sequenz ganz oder teilweise enthaltende DNA-Strukturen und Vektoren
- c) mit solcher DNA transformierte pro- oder eukaryotische Zellen,
- d) die von diesen Zellen aufgrund der Transformation experimierten Polypeptide oder Teile davon,
- e) deren Aminosäuresequenzen sowie deren Verwendung als Diagnostikum
- f) Antikörper gegen die Polypeptide unter (d) einschließlich ihrer Anwendung zur passiven Immunisierung, zur Diagnostik und zur Reinigung besagter Polypeptide
- g) Impfstoffe gegen HCMV, die Peptide und Aminosäuresequenzen von (e) alleine oder in Kombination enthalten,
- h) sowie ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung der unter (d) angeführten Polypeptide oder Teilen davon.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den nachfolgenden Beispielen, der Tabelle und den Patentansprüchen aufgeführt.

Beispiel 1: Konstruktion und Expression des Plasmids p 271

Zunächst wurde das Plasmid pHM 7 erzeugt durch Einbau des ca. 500 bp KpnI-SmaI Fragments (Nukleotide 1443 - 1936 von Tab. 1) in M13mp11. Man erhält das Plasmid p 271 durch Insertion des ca. 500 bp EcoRI-Sma I-Fragments von pHM 7 in pEX-2 (Stanley, K. und P. Luzio (1984) EMBO Journal 3, 1429 - 1434). Das Plasmid p 271 kodiert also für ein Fusionsprotein von etwa 133 kd, bestehend aus einem pp 28 Anteil (ca. 18 kd) fusioniert mit einem Cro/β-Galaktosidase-Hybridprotein (ca. 115 kd). Die Induktion der Expression in geeigneten *E. coli*-Stämmen erfolgt durch Hitzeinaktivierung eines temperatursensitiven Repressors. *E. coli* pop 2136 (Stanley, K. und P. Luzio a.a.o.) wurde zu einer Dichte von 0,2-0,3 (A_{600nm}) bei 30°C angezüchtet und die Synthese des Fusionsproteins durch schnellen Temperaturwechsel auf 42°C induziert. Nach 90 Min bei 42°C wurden die Zellen geerntet und das pp 28 Protein nach bekannten Methoden gereinigt. Das Fusionsprotein beträgt etwa 5 % der Gesamtproteinmasse.

Beispiel 2: Expressionsoptimierung von pp 28

Durch die nachstehend beschriebenen Umlonierungen konnte (1) die Expression von pp 28 als Fusionsprotein insgesamt verbessert und (2) der Fremdanteil im Fusionsprotein verkleinert werden. Als Ausgangsplasmid wurde pBD2IC2OH (vorgeschlagen in der deutschen Patentanmeldung P 37 27 137.7) gewählt. Dieses Plasmid kodiert also für einen gegenüber pEX-2 wesentlich (um mehr als 60 %) verkürzten β-Galaktosidase-Anteil, die Induktion erfolgte über das Lac-Promotor-System durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG).

Zwei Strategien wurden zur Klonierung des pp28-DNA-Fragmentes aus p271 gewählt:

- 1) p271 wurde mit EcoRI und SmaI geschnitten, die Eco RI-Überhänge mittels Klenow-Fragment aufgefüllt. Das resultierende ca. 500 bp-Fragment wurde in die SmaI-Stelle

von pBD2IC20H eingesetzt. Die Linkerregion des erzeugten Plasmids pGB10 hat die folgende DNA-Sequenz (verifiziert durch indirektes Sequenzieren am Doppelstrang):

(S) E (aufge-	S
(m) c füllt)	m
(a) o	a
(I) R	I
	I

GATGGGGATCCCCAATTGAGCTCGCCCGACC...CCCGGG
 -----+-----+-----+----- ca. 500bp---
 CTACCCCTAGGGTTAACGCTCGAGCGGGCATGG:::GGGCC
 aus pBD2IC20H>< aus p 271 >< pp28... >
 AspGlyAspProGlnPheGluLeuAlaArgThr...ProGly

2) Der Leserahmen in der Linkerregion von pBD2IC20H wurde durch Auffüllen der Bam HI-Stelle verschoben (=> Plasmid pGB11). Danach konnte das Eco RI/SmaI-Fragment aus p271 ohne vorheriges Auffüllen der Eco RI-Stelle direkt in das mit Eco RI und NruI geschnittene pGB11 eingesetzt werden. Die Linkerregion des resultierenden Plasmids pGB12 hat die folgende DNA-Sequenz:

E	(S N)
c	(m r)
o	(a u)
R	(I I)
I	

GATGGGGATCGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAACATTGAGCTCGCCCGTACC...CCCCGA
 -----+-----+-----+-----+-----+-----+----- ca. 500bp---
 CTACCCCTAGCTAGGGGCCATGGCTCGAGCTAACGCTCGAGCGGGCATGG...GGGGCT
 aus pGB11 >< aus p271 >< pp28... >
 AspGlyAspArgSerProGlyThrGluLeuGluPheGluLeuAlaArgThr...ProArg

Die Abschätzung der Färbeintensität der entsprechenden Proteinbanden nach Auftrennung von E. coli-Gesamtextrakten

ergab, daß nach Induktion des p271-kodierten Proteins dieses etwa 5 % des Gesamtproteingehalts ausmachte, während die entsprechenden Werte für pGB10 und pGB12 durchgängig bei etwa 20 % lagen. Wird der verringerte Fremdproteingehalt in den pGB10- und pGB12-kodierten gegenüber dem p271-kodierten Fusionsprotein in Betracht gezogen, ergibt sich durch die Verwendung von pGB10 bzw. pGB12 eine etwa zehnfache Steigerung der pp28-Expression.

Legende zu Tab. 1

Der für pp 28 kodierende offene Leserahmen beginnt bei Nukleotid 1400 und endet bei Nukleotid 1968. Der Bereich der cDNA von BUML-1 ist durch einen durchgezogenen Strich über den betreffenden Nukleotiden gekennzeichnet (Nukleotid 1416 bis 1683). Die abgebildete Sequenz beginnt (Nukleotid 801) mit der Hind III - Spaltstelle der Fragmente S und R. Eine Proteinsequenz mit teilweise überlappendem Leserahmen von Nukleotid 801 bis 1460 ist zusätzlich angegeben.

Legende zu Fig. 1

Oberer Teil: Physikalische Genomkarte von HCMV für die Restriktionsendonukleasen Hind III und EcoR I.

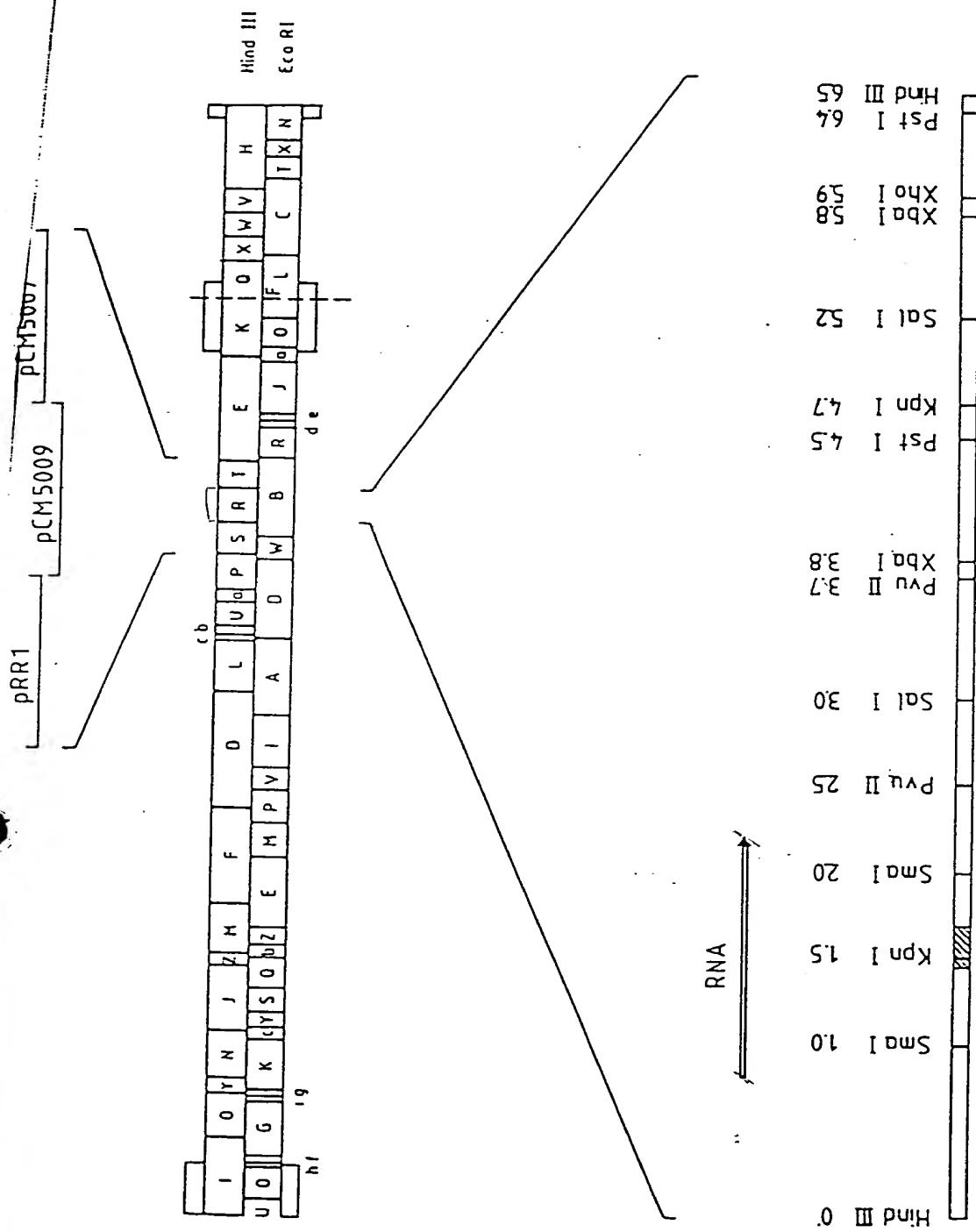
Unterer Teil: Restriktionskarte für das Hind III-R-Fragment. Die schraffierte Region zeigt den Bereich der cDNA des Klons BUML-1.

Tabelle 1

Patentansprüche

1. Strukturelles Phosphoprotein mit einem Molgewicht von etwa 28 kd (pp 28) aus humanem Cytomegalovirus (HCMV) und immunogene Teile davon, erhältlich durch Expression des Gens, das im Bereich des Fragments Hind III R des Genoms von HCMV, Stamm Ad 169, liegt, oder Teilen dieses Gens.
2. pp28 und immunogene Teile davon, erhalten durch Expression des Gens, das auf einem 1,0 kb SmaI-Fragment innerhalb des Hind III R-Fragments aus dem Genom von HCMV, Stamm AD 169, liegt oder Teilen dieses Gens.
3. pp28 oder Teile davon, erhalten durch Expression des Gens entsprechend Tabelle I, Nukleotid 1400 bis 1968.
4. DNA-Sequenz 1400-1968 gemäß Tabelle I, kodierend für pp28, sowie Allele und Derivate.
5. DNA-Strukturen und Vektoren, die das für pp28 kodierende Gen oder Teile davon nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4 enthalten.
6. Prokaryotische oder eukaryotische Zellen, die mit DNA-Strukturen oder Vektoren nach Anspruch 5 transformiert sind.
7. Verfahren zur Herstellung von pp28 oder immunogenen Teilen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man das nach Anspruch 1 für pp28 kodierende Gen ganz oder teilweise zur Expression bringt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man das 1,0 kb SmaI-Fragment aus dem Hind III R-Fragment einsetzt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man das Gen entsprechend Tabelle I, Nukleotid 1400-1936, einsetzt.
10. Diagnostika, die Proteine oder Teile davon nach Anspruch 1 bis 3 enthalten.
11. Diagnostika, die poly- oder monoklonale Antikörper gegen Proteine nach Anspruch 1 bis 3 enthalten.
12. Diagnostika, die DNA Sequenzen oder Teile davon nach Anspruch 4 oder dazu hybridisierende Sequenzen enthalten.
13. Impfstoffe, die Proteine oder Teile davon nach Anspruch 1, 2 oder 3 enthalten.
14. Impfstoffe, die Antikörper gegen Proteine nach Anspruch 1, 2 oder 3 enthalten.



१ अनुवाद